

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Ronald Malych

Vliv nedostatku a nadbytku iontů mědi na řasu *Ostreococcus tauri*

The effect of deficiency and excess of copper ions on the alga *Ostreococcus tauri*

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: RNDr. Róbert Šuták, Ph.D.

Praha 2017

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a konzultanta RNDr. Róberta Šuťáka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto děkuji doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc., bez něhož by tato práce neměla šanci vzniknout, dále pak RNDr. Janu Machovi, Ph.D. a RNDr. Róbertu Šutňákovi, Ph.D. za jejich ochotu a vstřícnost během psaní mé bakalářské práce a za veškeré rady. Na závěr bych rád poděkoval celé své rodině a přátelům za jejich podporu.

Seznam použitých zkratk

ATX1	antioxidační protein 1 (z angl. Antioxidant Protein 1)
BCA	bicinchoninová kyselina (z angl. Bicinchoninic acid)
BCS	disodná sůl 2,9-dimethyl-4,7-difenyl-1,10-fenanthrolin-disulfonové kyseliny (z angl. Bathocuproinedisulfonic acid disodium salt)
BPS	4,7-difenyl-1,10-fenanthrolinsulfonová kyselina (z angl. Bathophenanthroline sulfonate)
CBB	Coommassie brilliant blue G-250
CCC2	transportér kationtů a chloridů 2 (z angl. Cation-chloride co-transporter 2)
CCS	Cu-chaperone pro superoxiddismutasu (z angl. Copper chaperone for superoxide dismutase)
COX17	Cu-chaperone pro cytochrom <i>c</i> oxidasu (z angl. Cytochrome <i>c</i> oxidase copper chaperone)
CTR	přenašeč iontů mědi (z angl. Copper transporter)
DNP	2,4-dinitrofenylhydrazon
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
FEA1	protein asimilující ionty železa (z angl. Fe-assimilating protein 1)
FRE1	transmembránová jednotka 1 železitě/měďnaté reduktasy (z angl. Ferric/cupric reductase transmembrane component 1)
FRE2	transmembránová jednotka 2 železitě/měďnaté reduktasy (z angl. Ferric/cupric reductase transmembrane component 2)
FET3	ferroxidasa a oxidasa měďných iontů (z angl. Fe transport multicopperoxidase)
FET4	nízko-afinitní transportní protein pro Fe^{2+} ionty (z angl. Low-affinity Fe^{2+} transport protein)
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonová
HPLC	vysoko účinná kapalinová chromatografie (z angl. High performance liquid chromatography)

HSP20	protein teplotního šoku 20 (z angl. Heat shock protein 20)
IgG	imunoglobulin G
IscU	enzym tvořící železo-sírná centra (z angl. Iron-sulfur cluster assembly enzyme)
L1	silné ligandy schopné vázat ionty mědi
L2	slabé ligandy schopné vázat ionty mědi
MFM	modifikované f médium
MT	metalothioneiny
NCBI	National center for biotechnology information
ORCAE	Online resource for community annotation of eukaryotes
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate-buffered saline)
SCO1	protein syntetizující cytochrom <i>c</i> oxidasu 1 (z angl. Synthesis of cytochrome <i>c</i> oxidase 1)
SCO2	protein syntetizující cytochrom <i>c</i> oxidasu 2 (z angl. Synthesis of cytochrome <i>c</i> oxidase 2)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. Sodium dodecylsulfate)
SHAM	kyselina salicylhydroxamová (z angl. Salicylhydroxamic acid)
TEMED	tetramethylethyldiamin
TGS	pufr Tris, glycine, SDS
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

Abstrakt

Měď je esenciálním prvkem pro řadu organismů. Ionty mědi mají důležitou roli v respiraci, při transportu iontů železa a ve vývoji buněk. Mechanismus příjmu a utilizace iontů mědi je nejlépe popsán u *Saccharomyces cerevisiae*. Jedná se o velmi náročný proces složený z mnoha regulátorů, které udržují koncentraci iontů mědi pod toxickou hladinou. Toxicita těchto iontů se projevuje tvorbou reaktivních forem kyslíku reakcí, která je podobná Fentonově reakci.

Řasy jako fotosyntetické organismy, které obsahují jak plastidy, tak mitochondrie, jsou dobrým modelem pro studování příjmu a utilizace iontů mědi. Jako modelový organismus byl z řas vybrán *Ostreococcus tauri*, který je nejmenším volně žijícím eukaryotním organismem.

V této práci je řešena otázka jaký vliv má nedostatek a toxicita iontů mědi na buňky *O. tauri*. Imunochemickou analýzou bylo zjištěno, že nedochází ke změně v expresi enzymu cytochrom *c* oxidasy, která je součástí dýchacího řetězce a obsahuje měď vázající Cu_A centrum. Spektrofotometrickým stanovením bylo zjištěno, že nedostatek iontů mědi nemá vliv na tvorbu fotosyntetických pigmentů, chlorofylu *a* a *b*. Proteomickou analýzou byly zjištěny proteiny, kterých exprese byla ovlivněna toxicitou iontů mědi. Vliv toxické koncentrace iontů mědi na poškození proteinů oxidativním stresem a příjem iontů železa nebyly potvrzeny.

Klíčová slova: *Ostreococcus tauri*, ionty mědi, toxicita

Abstract

Copper is an essential element for many organisms. Copper ions play an important role in respiration, iron ion transport and cell development. The mechanism of uptake and utilization of copper ions is best described in *Saccharomyces cerevisiae*. This is a very demanding process, consisting of many regulators that maintain the concentration of copper ions below the toxic level. The toxicity of these ions is manifested by the formation of reactive oxygen species by reaction similar to the Fenton reaction.

Algae, being photosynthetic organisms that contain both plastids and mitochondria, are a good model for studying the uptake and utilization of copper ions. As algae model organism has been chosen *Ostreococcus tauri*, which is the smallest living eukaryote.

In this work, we are looking at the question of how cells of *O. tauri* deal with the deficiency and toxicity of copper ions. An immunochemical analysis revealed that there was no change in the expression of the enzyme cytochrome *c* oxidase, which is part of the respiratory chain and contains Cu_A domain that binds atoms of copper. Spectrophotometric assay showed that the lack of copper ions does not affect the formation of photosynthetic pigments, chlorophyll *a* and *b*. Proteomic analysis revealed proteins whose expression was affected by the toxicity of copper ions. The effect of toxic concentrations of copper ions on protein damage by oxidative stress and on the uptake of iron ions has not been confirmed.

Keywords: *Ostreococcus tauri*, copper ions, toxicity

Obsah

1	Přehled literatury	9
1.1.	Vlastnosti mědi a její role v organismech	9
1.1.1.	Vlastnosti mědi, ligandy a koordinace	10
1.1.2.	Příjem iontů mědi	12
1.1.3.	Distribuce iontů mědi v buňce	13
1.1.4.	Toxicita a detoxikace iontů mědi	15
1.2.	Proč studovat řasy?	16
1.3.	Měď v oceánech	18
1.4.	<i>Ostreococcus tauri</i>	19
2	Cíle práce	20
3	Materiál a metody	21
3.1.	Kultivace buněk	21
3.2.	Zpracování buněčných kultur	22
3.3.	Příprava buněčných lyzátů	23
3.4.	Stanovení množství proteinů	23
3.5.	Stanovení množství chlorofylu <i>a</i> a <i>b</i>	24
3.6.	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	24
3.7.	Elektropřenos a imunodetekce	26
3.8.	Měření oxidativního stresu metodou OxyBlot	28
3.9.	Hmotnostní spektrometrie	29
3.10.	Radioaktivní značení	30
3.11.	Nativní elektroforéza	31
4	Výsledky	32
4.1.	Nedostatek iontů mědi	32
4.1.1.	Cytochrom <i>c</i> oxidasa a nedostatek iontů mědi	32
4.1.2.	Chlorofyl a nedostatek iontů mědi	34
4.2.	Nadbytek iontů mědi	36
4.2.1.	Nadbytek iontů mědi a jejich toxicita	36
4.2.2.	Proteomická analýza	38
4.2.3.	Radioaktivní značení pomocí ⁵⁵ Fe	40
5	Diskuze	42
6	Závěr	45
7	Literatura	46

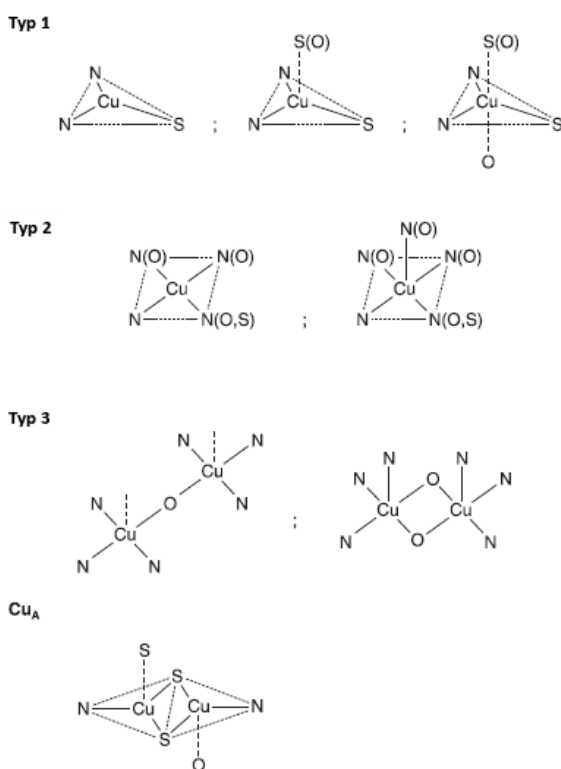
1 Přehled literatury

1.1. Vlastnosti mědi a její role v organismech

Měď jako esenciální stopový prvek hraje významnou roli v mnoha biochemických procesech buněk všech organismů. Hraje důležitou roli jako kofaktor při biologických procesech - respirace, transport iontů železa a vývoj buněk. Hlavní funkcí je však především přenos elektronů, který kromě iontů mědi, vykonávají také ionty železa. Pravděpodobný nárůst významnosti mědi jako biogenního prvku v rámci vývoje života byl zapříčiněn zvýšením koncentrace kyslíku v atmosféře. Od té doby se proteiny obsahující ionty mědi rozšířily do všech forem života (prokaryota i eukaryota), kde vykonávají funkci elektronových přenašečů spolu s železo-sirnými centry a někde dokonce úplně nahradily proteiny obsahující ionty železa v redoxních reakcích v buňce [1]. Zároveň je však pro buňky důležité udržovat koncentraci iontů mědi v rovnováze, neboť může docházet ke vzniku volných radikálů tzv. Fentonovou reakcí, případně docházet k rozrušování struktur některých proteinů. Pro udržení potřebné rovnováhy si buňky vytvořili specializované systémy proteinů a mechanismy pro příjem, distribuci a uchovávání iontů mědi [2]–[5].

1.1.1. Vlastnosti mědi, ligandy a koordinace

Cu centra v proteinech se rozdělují celkem do čtyř skupin: typ 1, typ 2, typ 3, Cu_A a Cu_B centra. Typ 1 nejvíce zastupují tzv. cupredoxiny. Jejich hlavní funkcí je elektronový transport, který zabezpečují změnami redoxního stavu atomu mědi mezi Cu^{1+} a Cu^{2+} . Absorpční maximum mají při vlnové délce 600 nm, proto se někdy nazývají modré měďnaté proteiny. Do této skupiny patří proteiny jako plastocyanin, azurin nebo umecyanin. Druhou skupinou jsou proteiny typu 2, které jsou z největší části oxidoreduktasami. Nejznámějším proteinem této skupiny je superoxid dismutasa. Na rozdíl od předchozích dvou skupin, které obsahují pouze jeden atom mědi, typ 3 obsahuje dva atomy mědi. Nejznámějším zástupcem je kyslík přenášející protein hemocyanin. Do této skupiny dále patří i některé oxidasy. Poslední skupinou jsou Cu_A a Cu_B centra, která jsou součástí komplexu IV dýchacího řetězce (cytochrom *c* oxidasy). Obě centra slouží jako přenašeče elektronů uvnitř enzymového komplexu. Cu_A přenáší elektron na hem a ten dále přenáší tento elektron na Cu_B za účasti kyslíku [1], [6].



Obr. 1 - Shrnutí možných koordinací atomů mědi v jednotlivých typech center proteinů obsahujících ionty mědi. Převzato a upraveno z [1].

Velmi důležitá vlastnost ligandů, které váží ionty mědi, je jejich vliv na redoxní potenciál heteroatomu mědi. Tato vlastnost je důležitá jak pro enzymy obsahující ionty mědi, kde pomáhá při katalýze redoxních funkcí, tak pro proteiny, které se účastní transportu mědi, kde zabraňuje přeměně mezi Cu^{2+} a Cu^{1+} . Reaktivitu iontů mědi určuje koordinační prostředí, v kterém se ionty nachází. Při kladném redoxním potenciálu budou převládat Cu^{1+} , při záporném budou převládat Cu^{2+} . Nebezpečí pro organismus nastává ve chvíli, kdy dochází k redukci Cu^{2+} na Cu^{1+} . Následnou oxidací Cu^{1+} zpět na Cu^{2+} pomocí O_2 nebo H_2O_2 vznikají nebezpečné hydroxylové radikály [6]. Proteiny obsahující ionty mědi mají v organismu mnoho biologických funkcí, od transportu elektronů, přes katalýzu redoxních reakcí některých biologických substrátů až po transport kyslíku, tak jak to ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1 - Funkce vybraných proteinů obsahujících ionty mědi, které se nacházejí v prokaryotech i eukaryotech. Převzato a upraveno z [6].

Proteiny obsahující ionty mědi	Funkce
<i>Elektron přenášející proteiny</i>	
Azurin	Elektronový přenos v respiraci
Cytochrom <i>c</i> oxidasa	Elektronový přenos v respiraci
Plastocyanin	Elektronový přenos ve fotosyntéze
<i>Oxidoreduktasy</i>	
Superoxid dismutasa	Přeměna superoxidových radikálů na peroxid vodíku
Asorbát oxidasa	Oxidace askorbátu
Ceruloplasmin	Oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+}
Nitrit reduktasa	Redukce NO_2^- na N_2
<i>Ostatní</i>	
Hemocyanin	Transport O_2

1.1.2. Příjem iontů mědi

Transport iontů mědi byl podrobně popsán u kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*, kde probíhá za pomoci dvou rozdílných drah a to v závislosti na koncentraci volných iontů mědi. V aerobních podmínkách je většina volných iontů mědi ve formě Cu^{2+} . Při dostatečné dostupnosti volných iontů mědi v prostředí, slouží jako přenašeč iontů přechodných kovů (Cu, Fe, Mn a Zn) u *S. cerevisiae* protein Fet4. Když však dojde k poklesu koncentrace iontů mědi, buňka zvýší expresi pro tvorbu reduktasy potřebné na redukci Cu^{2+} na Cu^{1+} a zároveň zvýší počet vysoko afinitních přenašečů CTR na povrchu membrány. Vysoko-afinitní příjem je tedy realizován pomocí membránových proteinů s názvem CTR. Jsou to malé membránové proteiny s třemi membránovými doménami a N-koncem bohatým na methioniny. Přesto, že se ionty mědi vyskytují ve dvou stavech, jako Cu^{2+} a Cu^{1+} , substrátem pro CTR přenašeče je pouze Cu^{1+} . Redukce Cu^{2+} na Cu^{1+} je zabezpečena reduktasami FRE1 a FRE2, které se také podílejí na příjmu železa. Pro svou funkci CTR proteiny nepotřebují ATP. Transport Cu^{1+} funguje jako antiport mezi $\text{Cu}^{1+}/2\text{K}^{+}$. Je tedy závislý na mimobuněčné koncentraci K^{+} iontů a vnitrobuněčné koncentraci Cu^{1+} [7]–[9].

Kromě CTR přenašečů existují ještě další typy přenašečů iontů mědi. Jedná se především o ATPasové pumpy, zejména $\text{P}_{1\text{B}}$ ATPasy. Tyto proteiny zabezpečují přenos iontů mědi přes membrány - mají za úkol udržovat iontové gradienty, iontovou rezistenci a správnou hladinu iontů v buňce. Tyto přenašeče, jak už název napovídá, využívají jako zdroj energie ATP. Nacházejí se téměř ve všech formách života, ale dominují zejména u bakterií. Wilsonova a Menkesova choroba jsou úzce spjaté s tímto druhem ATPas. Lokalizovány jsou na membráně Golgiho aparátu. Měď transportující ATPasy jsou jedny z prvních objevených ATPas u lidí. Patří do větší rodiny transportérů těžkých kovů. Všechny proteiny této rodiny mají 6 až 8 transmembránových segmentů na C-konci cytosolové ATP vázající domény. ATPasy významné pro Menkesovu a Wilsonovu chorobu mají mezi sebou vysokou homologii. Identita mezi jednotlivými sekvencemi těchto dvou proteinů je 57 % [1].

1.1.3. Distribuce iontů mědi v buňce

Toxicita a reaktivita volných iontů mědi byla příčinou vzniku specializovaných mechanismů pro kontrolovanou distribuci uvnitř buňky. Tato distribuce je zabezpečena transportními proteiny, které se nazývají metalochaperony. Jejich hlavní funkcí je ochrana iontů mědi před detoxikačními mechanismy buňky (před chelatací metalothioneiny) a následný přenos do místa určení (k proteinu, který daný iont potřebuje). Zároveň však fungují i jako ochrana, protože zabráňují redoxnímu cyklu iontů mědi a tím zabráňují tvorbě reaktivních forem kyslíku v buňce [6].

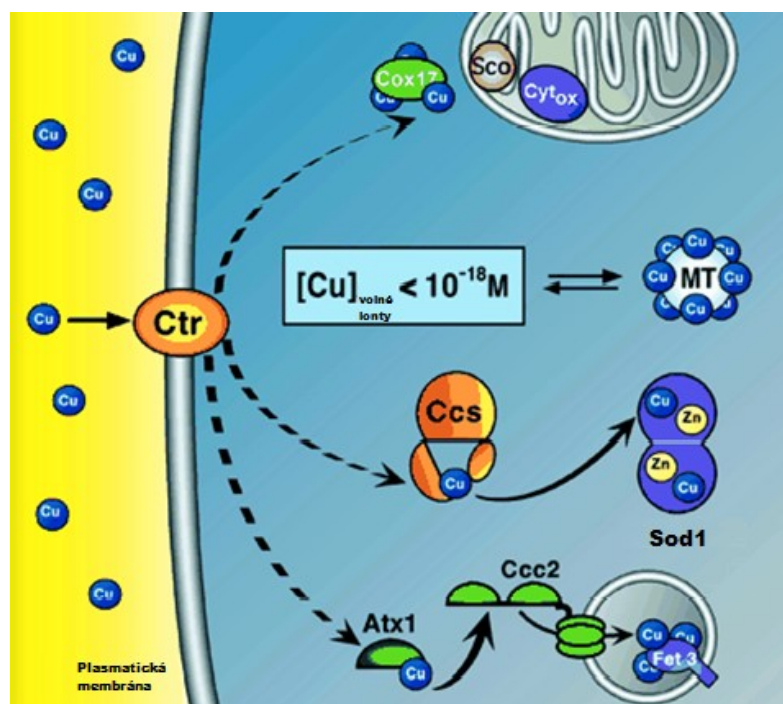
Protože ionty kovů nejsou důležité pouze pro správnou funkci buněk, ale jsou i značně toxické, buňky si vytvořili celou řadu detoxikačních mechanismů zabráňujících akumulaci nebezpečných volných iontů kovů [10]. Studium enzymu superoxid dismutasy u *S. cerevisiae* byla stanovena celková koncentrace volných iontů mědi uvnitř buňky, která se pohybuje v menších než atomolárních koncentracích (což by znamenalo jeden atom mědi na buňku) [11]. I přes tyto velmi nízké koncentrace volných iontů mědi jsou Cu-chaperony schopné dodávat potřebné množství iontů mědi enzymům, které je potřebují.

Všechny Cu-chaperony vážou ionty mědi v redukované formě Cu^{1+} . Existují tři skupiny Cu-chaperonů přenášejících ionty mědi u eukaryotních buněk. Chaperon ATX1 přenáší ionty mědi do vezikul Golgiho aparátu v sekreční dráze buňky. Chaperon CCS je přenašečem iontů mědi pro superoxid dismutasu [1]. Do třetí skupiny patří Cu-chaperony přenášející ionty mědi do mitochondrie. Této dráhy se účastní protein COX17 spolu s dalšími dvěma molekulami SCO1 a SCO2, které jsou navzájem homologní [5]. Všechny tyto proteiny byly nalezeny pomocí genové manipulace *S. cerevisiae*. Později byly identifikovány i v dalších eukaryotních organismech.

ATX1 byl při svém objevu označen jako antioxidant [12]. Později se zjistilo, že jeho primární funkcí je transport iontů mědi do Golgiho aparátu. Na membráně této organely se nachází ATPasa CCC2 zodpovědná za přenos iontů mědi do lumen Golgiho aparátu. Patří do skupiny tzv. P ATPas, které využívají pro transport iontů energii z hydrolýzy ATP. Po přenosu do Golgiho aparátu se ionty mědi zabudovávají do FET3 oxidoreduktasy, což je enzym sloužící hlavně k distribuci a transportu iontů železa [13].

CCS zodpovídá za přenos iontů mědi pro superoxid dismutasu. Superoxid dismutasa funguje jako ochrana před oxidativním stresem. Z větší části se nachází v cytosolu buněk. Existuje však i malá část v mitochondriích, kde chrání před radikály, které vznikají v dýchacím řetězci. CCS je největším dosud objeveným Cu-chaperonem [10], [14].

COX17 slouží jako přenašeč iontů mědi pro cytochrom *c* oxidasu. Cytochrom *c* oxidasa je enzym, který pro svou funkci potřebuje 3 ionty mědi. Obsahuje dvě podjednotky s měď vázajícím centrem Cu_A a Cu_B. Způsob, jakým dochází k přenosu iontů mědi do jednotlivých center, není úplně znám. Předpokládá se, že COX17 předává ionty mědi SCO1 a SCO2, které je pak zabudovávají do jednotlivých center cytochrom *c* oxidasy [10], [14].



Obr. 2 - Distribuce iontů mědi v eukaryotní buňce. Přenos dovnitř buňky je zabezpečen pomocí přenašeče CTR. Uvnitř buňky dochází k distribuci iontů mědi třemi drahami pomocí Cu-chaperonů. Chaperon ATX1 přenáší ionty mědi k ATPase CCC2, která pumpuje ionty mědi do lumen Golgiho aparátu v sekreční dráze buňky. V Golgiho aparátu se ionty mědi zabudovávají do oxidoreduktasy FET3. Chaperon CCS přenáší ionty mědi do superoxid dismutasy. Chaperon COX17 přenáší ionty mědi do mitochondrie. V mitochondrii předává ionty mědi SCO1 a SCO2, které je pak zabudovávají do jednotlivých center cytochrom *c* oxidasy. Cytosolickou koncentraci volných iontů mědi udržují pod koncentrací 10^{-18} M metalothioneiny (MT). Převzato a upraveno z [10].

1.1.4. Toxicita a detoxikace iontů mědi

Destruktivní potenciál iontů mědi je zapříčiněn zejména dvěma vlastnostmi tohoto kovu. První je schopnost změny redoxního stavu uvnitř buňky, mezi Cu^{1+} a Cu^{2+} stavem. Dochází tak k reakci podobné Fentonově reakci, kde Cu^{1+} reaguje s peroxidem vodíku za vzniku Cu^{2+} a vysoce reaktivního hydroxylového radikálu. Druhou toxickou vlastností je schopnost tvořit nespecifické vazby s postranními řetězci aminokyselin jako cystein, methionin nebo histidin. Vazba na tyto aminokyseliny může mít za následek snížení aktivity enzymu, případně nahrazení kofaktoru a tím přerušení funkce enzymu. Kvůli těmto nebezpečným vlastnostem iontů mědi si buňky musely vytvořit mechanismus, kterým jsou schopné okamžitě reagovat na zvýšení koncentrace daných iontů oproti normálnímu stavu. Jednou z možností jak zabránit akumulaci toxických iontů mědi (jak detoxifikovat) je jejich sekvestrace tak, aby nedocházelo ke změnám redoxního stavu. Když dojde k zvýšení koncentrace volných iontů mědi uvnitř buňky, začnou se tvořit malé proteiny bohaté na cysteiny, které se nazývají metalothioneiny [4]. Tyto proteiny jsou tvořeny asi 60 aminokyselinami, které z velké části tvoří cysteiny, kterých může být až 20. V organismu mají mnoho funkcí od detoxifikace iontů těžkých kovů, přes vychytávání reaktivních forem kyslíku až po kontrolu buněčné smrti [15].

1.2. Proč studovat řasy?

Řasy jsou fotosyntetickými organismy, které obsahují jak plastidy, tak mitochondrie, jsou dobrým modelem pro studování celobuněčné homeostázy esenciálních prvků, zejména přechodných kovů jako železo, zinek nebo měď. Chloroplast a mitochondrie jsou organely náročné na spotřebu iontů kovů, které potřebují pro správnou funkci řady enzymů. Kvůli těmto dvěma organelám si musely fotosyntetické organismy vytvořit mechanismy pro kontrolovanou distribuci iontů kovů. Další výhodou řas pro studování homeostázy přechodných kovů je rozmanitost prostředí, ve kterém se vyskytují [16].

Velký podíl na evoluci řas měly přechodné kovy železo a měď. Železo ve své rozpustné podobě jako Fe^{2+} se vyskytovalo v hojném množství v původní anaerobní atmosféře Země. S příchodem fotosyntetických organismů však došlo k nárůstu koncentrace kyslíku v atmosféře. Následkem byla změna rozpustnosti mědi a zvýšení její dostupné formy pro organismy [1], [6].

Jednou z možností, jak se řasy dají rozdělit do různých skupin, je podle přítomnosti genů kódujících na železe závislý protein cytochrom c_6 a na mědi závislý protein plastocyanin. První skupina řas obsahuje oba geny pro cytochrom c_6 i plastocyanin, druhá skupina má pouze gen pro cytochrom c_6 a třetí skupina pouze gen pro plastocyanin. Do první skupiny patří například řasa *Chlamydomonas reinhardtii* [16]. Tato řasa je v podmínkách s nedostatečnou dostupností mědi schopná nahradit plastocyanin cytochromem c_6 , který funguje jako rezerva v případě nedostatku iontů mědi [17].

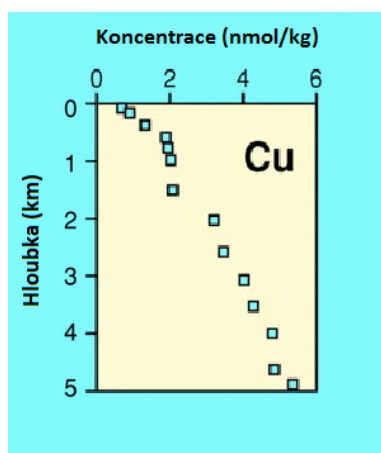
Jako modelový organismus pro studium biochemických a molekulárně biologických pochodů u řas se stala již zmiňovaná řasa *C. reinhardtii*. Hlavními proteiny, které obsahují ionty mědi u *C. reinhardtii* jsou cytochrom c oxidasa jako součást dýchacího řetězce v mitochondrii, plastocyanin jako součást elektron transportního řetězce při fotosyntéze a speciální oxidasa, která pomáhá při asimilaci iontů železa [18].

Protože ionty mědi jsou ve zvýšených koncentracích značně toxické, buňky regulují jejich asimilaci. Podobně jako u *S. cerevisiae* mají řasy systém mechanismů pro přenos, distribuci a asimilaci iontů mědi. U *C. reinhardtii* slouží při vysoko-afinitní asimilaci iontů mědi proteiny skupiny CTR (copper transporter). Transport těchto iontů je závislý na redukci Cu^{2+} pomocí reduktasy. Cu^{1+} jsou substrátově specifické pro CTR proteiny a tím je zabezpečen jejich transport [16].

1.3. Měď v oceánech

Distribuce přechodných prvků v oceánech umožňuje zkoumat jejich vliv na fytoplankton. Jedním z těchto přechodných prvků je i měď. Měď hraje důležitou roli v růstu fytoplanktonu. Je součástí metabolických drah v buňkách, ale zároveň ve vyšších koncentracích vykazuje toxické vlastnosti. Toxické jsou hlavně volné ionty mědi ve formě Cu^{2+} . Většina těchto iontů je však v oceánu silně vázána na organické ligandy, u kterých se předpokládá, že jsou produkovány živými organismy. Až 99 % iontů mědi vytváří s organickými ligandy komplexy. Tyto sloučeniny se mohou vyskytovat až do hloubky 3000 metrů [19]. Organicky vázaná měď ve většině oceánů značně snižuje koncentrace volných iontů mědi. Komplexy schopné vázat ionty mědi se rozdělují do dvou skupin, silnější L1 a slabší L2. Dosud není příliš známo o původu těchto sloučenin. Jedním z kandidátů jsou mořské cyanobakterie rodu *Synechococcus*, které jsou velmi citlivé na zvýšenou koncentraci iontů mědi ve svém okolí [20]–[22].

Měď jako důležitý biogenní prvek dosahuje v oceánech nanomolárních koncentrací. Distribuce je značně závislá na hloubce, jak ukazuje graf 1 [23].



Graf 1 - Distribuce mědi v závislosti na hloubce v severním Tichém oceánu. Převzato a upraveno z [23].

1.4. *Ostreococcus tauri*

O. tauri je nejmenší doposud objevený volně žijící eukaryotní organismus. Tato jednobuněčná zelená řasa patří do jedné z nejstarších skupin *Prasinophyceae*. Byla objevena ve Středozemním moři u břehů Francie v roce 1994. Od jejího objevu byla zkoumána hlavně kvůli své jednoduché stavbě, velikosti genomu a jednoduché kultivaci. Jako součást mořského fytoplanktonu hraje důležitou roli v ekosystému. Mořský fytoplankton se podílí z velké části na celkové fotosyntetické aktivitě planety, tvorbě biomasy a koloběhu uhlíku na Zemi [24]–[26].

Stavba těchto nejmenších eukaryotních organismů je velmi jednoduchá. Velikost buněk se pohybuje kolem 0,8 μm . Buňky kulovitého tvaru nemají buněčnou stěnu a obsahují pouze jeden chloroplast, mitochondrii, Golgiho aparát a jádro [24]–[26].

Zvláštností pro *O. tauri* je, že nemá gen pro cytochrom c_6 , který u některých řas nahrazuje plastocyanin jako přenašeč elektronů při fotosyntéze. Udržet správnou hladinu iontů mědi pro funkci plastocyaninu je tedy velmi důležité [27].

2 Cíle práce

Ověřit, jak nedostatek iontů mědi ovlivňuje buňky *O. tauri*:

- vliv na expresi cytochrom *c* oxidasy, enzymu obsahujícího Cu_A centrum
- vliv na syntézu chlorofylu *a* a *b*

Ověřit, jakým způsobem dochází k poškození buněk *O. tauri* za podmínek nadbytku iontů mědi:

- sledování oxidativního stresu
- pozorování toxického efektu iontů mědi na buňky pomocí proteomické analýzy
- vliv na příjem a utilizaci iontů železa

3 Materiál a metody

3.1. Kultivace buněk

Všechny pokusy byly prováděny na kmenu řasy *O. tauri*, druh OTTH 0595 poskytnut spolupracující laboratoří Institutu Jacques Monod v Paříži. Kultivace buněk probíhala ve sterilních plastových nádobách. Víčka nádob obsahovala milipórový filtr, který umožňuje volný průchod plynů a zároveň zabraňuje kontaminaci. Buňky byly kultivovány při 17 °C ve 12 hodinovém denním cyklu v kultivačním boxu Versatile Environmental Test Chamber MLR-352-PE (Panasonic Biomedical Sales, Japonsko). Jako kultivační médium sloužilo medium MFM (složení viz tabulka 2). Médium bylo sterilizováno filtrací přes membránu o definované velikosti póru 0,22 µm (Corning, USA). Na počátku kultivace bylo standardně využito 2-4 ml inokula dobře narostlé kultury, které se přidávalo do 50 ml čerstvého média. Buňky byly sklizeny vždy sedmý den od začátku kultivace. Z předchozích kultivačních pokusů [28] byla zvolena koncentrace přídatku citrátu železitého na 100 nM, pro podmínky s dostatečným množstvím iontů železa. Pro podmínky s dostatečným množstvím iontů mědi byl k buňkám přidán pentahydrát síranu měďnatého na finální koncentraci 100 nM. Tato koncentrace byla určena na základě pokusů se zvyšující se koncentrací pentahydrátu síranu měďnatého a následným měřením proteinů (viz kapitola 4.2.1.). Pro limitující podmínky bylo využito chelátoru jednomocné mědi BCS (Sigma, USA) [28].

Tabulka 2 - Složení média MFM, doplněno H₂O do 1 l; pH 7,5 - upraveno pomocí 3 M HCL

Složka	Objem/Hmotnost (na 1 l média)
mořská sůl – SeaSalts (Sigma, USA)	40 g
HEPES (Sigma, USA)	1 g
NH ₄ NO ₃ (Sigma, USA)	1 ml 30 mM roztoku
NaNO ₃ (Sigma, USA)	1,5 ml 0,6 M roztoku
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O (Sigma, USA)	1 ml 0,1 M roztoku
Vitamíny	1 ml(složení viz tabulka 3)
Stopové prvky	1 ml (složení viz tabulka 4)
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (Penta)	15 mg

Tabulka 3 - Vitamíny, doplněno H₂O do 100 ml

Složka	Objem/Hmotnost (na 100 ml roztoku)
thiamin chlorid (Sigma, USA)	200 mg
biotin (Sigma, USA)	0,5 ml 0,25 mg/ml roztoku
kobalamin (Sigma, USA)	1 ml 0,1 mg/ml roztoku

Tabulka 4 - Stopové prvky, doplněno H₂O do 500 ml

Složka	Hmotnost (na 500 ml roztoku)
MnCl₂.4H₂O (Sigma, USA)	100 mg
ZnSO₄.7H₂O (Sigma, USA)	20 mg
Na₂MoO₄.2H₂O (Sigma, USA)	10 mg
CoCl₂.6H₂O (Sigma, USA)	7 mg
Na₃VO₄(Sigma, USA)	5 mg
NiCl₂.6H₂O (Sigma, USA)	5 mg
H₂SeO₃(Sigma, USA)	5 mg

3.2. Zpracování buněčných kultur

Před každým z následujících pokusů a stanovení byly buněčné kultury zpracovány tímto postupem. Buněčné kultury byly přeneseny do velkých centrifugačních kyvet (500 ml) pro výkyvný rotor centrifugy Avanti J-26 XPI (Beckman Coulter, USA). Podmínky centrifugace byly následující: 3000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml čistého média MFM a znovu centrifugován za stejných podmínek na stolní centrifuze. Když po stočení nebyly pelety okamžitě použity na pokus, byly uchovány při teplotě - 80 °C.

3.3. Příprava buněčných lyzátů

Příprava buněčných lyzátů probíhala pomocí sonikace v lyzačním pufru, který se skládal z 10 mM HEPES (Sigma, USA), 1 % Triton X-100 (Sigma, USA) o pH 7,5 s inhibitory proteas cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Buňky byly sonikovány pomocí sonikátoru SONOPULS mini20 (Bandelin, Německo), který má malou sondu pro sonikaci v malých objemech. Sonikace buněk probíhala po dobu 1 minuty, za střídání pulzů trvajících jednu sekundu s následnou vteřinovou pauzou při 40 % amplitudě. Pro dostatečné chlazení vzorku probíhala sonikace na ledu.

3.4. Stanovení množství proteinů

Ke stanovení množství proteinů ve vzorcích byla použita metoda s využitím bicinchoninové kyseliny (BCA) podle návodu výrobce (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma). Princip metody spočívá v tvorbě měďnatého komplexu v alkalickém prostředí. Redukce tohoto komplexu na měďnatou sůl se projevuje změnou barvy ze zelené na modro-fialovou s absorpčním maximem při vlnové délce 562 nm. Reakční směs vzniká smísením 4 % roztoku pentahydrátu síranu měďnatého se směsí kyseliny bicinchoninové, uhličitanu sodného, sodnou solí kyseliny dihydroxybutandiové, hydrogenuhličitanu sodného a hydroxidem sodným. Pro měření bylo využito vždy 10 µl vzorku, které se smíchaly s 1 ml reakční směsí. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byla změřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru UV-VIS Spectrophotometer UV-2600 (Shimadzu, Japonsko). Jako proteinový standard pro stanovení kalibrační přímky byl při každém novém stanovování množství proteinů využit hovězí sérový albumin (Sigma, USA).

3.5. Stanovení množství chlorofylu *a* a *b*

Pelety buněk z 50 ml buněčné kultury byly dezintegrovány sonikací v 200 µl lyzačního pufru (viz kapitola 3.3.). Lyzáty byly rozděleny na poloviny. Extrakce chlorofylu byla provedena ze 100 µl lyzátu. Zbytek byl použit na stanovení množství proteinu. Pro extrakci chlorofylu bylo k 100 µl buněčného lyzátu přidáno 900 µl 90 % chlazeného acetonu. Následně byla suspenze centrifugována při 10 000 g při pokojové teplotě po dobu 10 minut, aby došlo k odstranění precipitátu proteinů a zbytků buněčné stěny. Po centrifugaci byl supernatant použit pro měření absorbance v rozmezí vlnových délek 600-800 nm.

Pro výpočet množství extrahovaného chlorofylu byla využita rovnice pro spektrofotometrické stanovení z určených molárních absorpčních koeficientů chlorofylu *a* a *b* extrahovaných v 80 % acetonu [29].

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = 12,25 \cdot A_{663,6} - 2,55 \cdot A_{646,6}$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = 20,31 \cdot A_{646,6} - 4,91 \cdot A_{663,6}$$

3.6. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Vzorky na SDS elektroforézu byly připraveny přidáním 200 µl vzorkového pufru (viz tabulka 5) k 200 µl buněčného lyzátu. Buněčné lyzáty jednotlivých vzorků byly připraveny sonikací ve 200 µl lyzačního pufru (viz kapitola 3.3.). Vzorky byly povařeny po dobu 10 minut, centrifugovány 1 minutu při 20 000 g na stolní centrifuze. Do jednotlivých drah polyakrylamidového gelu v aparatuře bylo pipetováno po 10 µg celkových proteinů. Pro elektroforézu byly použity 15 % polyakrylamidové gely vlastní přípravy. Jako standard byl využit Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA). Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 150 V po dobu cca 90 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl gel použit pro elektropřenos. Složení elektrodového pufru dokumentuje tabulka 6. Při přípravě polyakrylamidového gelu se postupovalo podle tabulky 7.

Tabulka 5 - Složení vzorkového pufru

Složka	Objem
1 M Tris (pH 6,8)	2,4 ml
10 % SDS	2 ml
Glycerol	2,5 ml
Destilovaná voda	1,6 ml
0,2 % bromfenolová modř	1 ml
β-merkapt ethanol	0,5 ml

Tabulka 6 - Složení elektrodového pufru, doplněno H₂O do 1 l; pH 8,3 - upraveno pomocí 3 M HCl

Složka	Hmotnost (na 1 l pufru)
Tris (Sigma, USA)	3 g
Glycine (Sigma, USA)	14 g
SDS (Sigma, USA)	1 g

Tabulka 7 - Složky pro přípravu polyakrylamidového gelu

Složka	Dělicí gel (15 %)	Zaostřovací gel (5 %)
Akrylamid a bisakrylamid (Bio-Rad, USA)	2 ml	0,24 ml
Tris s SDS	2 ml*	0,76 ml**
Destilovaná voda	0 ml	0,47 ml
TEMED (Thermo Scientific, USA)	5 µl	5 µl
10 % persíranamonný	40 µl	20 µl

* složení Tris s SDS - 9,1 g Tris, 0,2 g SDS v 50 ml H₂O, pH 8,8

** složení Tris s SDS - 3 g Tris, 0,2 g SDS v 50 ml H₂O, pH 6,8

3.7. Elektropřenos a imunodetekce

Pro elektropřenos bylo využito polosuchého elektro-blotovacího systému Fastblot B33 (Biometra, Německo). Byl poskládán tzv. sendvič (v pořadí od anody ke katodě): porézní houbička, filtrační papír, nitrocelulózová membrána, polyakrylamidový gel, filtrační papír a houbička. Jako blotovací pufr byla použita směs 10 x TGS (Bio-Rad, USA), methanolu a destilované vody (viz tabulka 8). Elektropřenos probíhal po dobu 75 minut, při nastavení $1,5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ membrány. Po skončení elektropřenosu bylo provedeno barvení membrány v Ponceau S (složení viz tabulka 9). Jako kontrola byl použitý gel ponořen do barvicího roztoku (složení viz tabulka 10) na 60 minut a poté do odbarvovacího roztoku (složení viz tabulka 11) do vybělení pozadí.

Tabulka 8 - Složení blotovacího pufru

Složka	Objem
10 xTGS (Bio-Rad, USA)	100 ml
Methanol	200 ml
Destilovaná voda	700 ml

Tabulka 9 - Složení Ponceau S

Složka	Objem/Hmotnost
Ponceau S	20 mg
Kyselina octová	2 ml
Destilovaná voda	198 ml

Tabulka 10 - Složení barvicího roztoku

Složka	Objem/Hmotnost
CBB	250 mg
Ethanol/methanol	225 ml
Destilovaná voda	225 ml
Kyselina octová	50 ml

Tabulka 11 - Složení odbarvovacího roztoku

Složka	Objem
Ethanol/methanol	250 ml
Destilovaná voda	650 ml
Kyselina octová	100 ml

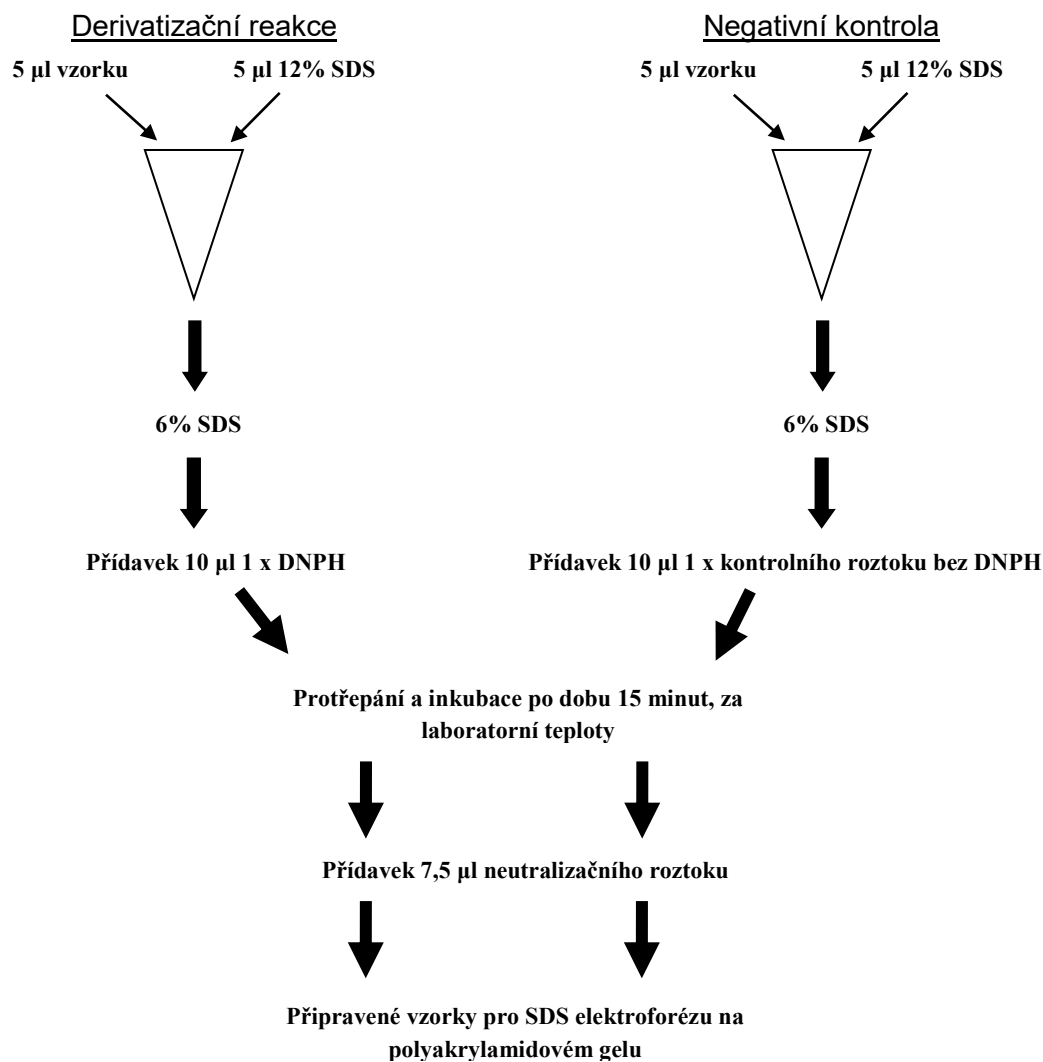
Po barvení Ponceau S byla na membráně provedena imunodetekce. Membrána byla zablokována 2 % blokovacím roztokem (složení viz tabulka 12) při 4°C, přes noc. Po zablokování došlo k inkubaci s králičí polyklonální protilátkou proti podjednotce 2 cytochrom *c* oxidasy (Agrisera, Švédsko) po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty. Před použitím byla primární protilátka zředěna 2 % blokovacím roztokem poměrem 1:1000. Po inkubaci s primární protilátkou a následném promytí 3 x 15 minut 2 % blokovacím roztokem byla přidána sekundární (kozí) protilátka proti králičímu IgG s navázanou křenovou peroxidasou (Sigma, USA) s ředěním 1:5000. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala za stejných podmínek jako u primární protilátky. Po následném promytí 2 x 15 minut 2 % blokovacím roztokem a 1 x 15 minut fosfátovým pufrém (PBS) byla nitrocelulózová membrána vyvolána chemiluminiscenčně v přístroji Amersham Imager 600 (GE Healthcare, UK), pomocí komerčního peroxidasevého chemiluminiscenčního substrátu Chemiluminiscent Peroxidase Substrate - 1 (Sigma, USA).

Tabulka 12 - Složení 2 % blokovacího roztoku

Složka	Objem/Hmotnost
Blotting-Grade blocker (Bio-Rad, USA)	10 g
Tween20(Sigma, USA)	0,25 ml
1 x PBS	500 ml

3.8. Měření oxidativního stresu metodou OxyBlot

Vzorky byly připraveny z peletů buněk dezintegrováných sonikací ve 200 μ l lyzačního pufru (viz kapitola 3.3.). Část z jednotlivých lyzátů byla odebrána pro změření množství proteinů. Zbytek lyzátu byl dále zpracován pomocí OxyBlot™ protein oxidation detection kit (Millipore, USA) a dle schématu na obr. 3.



Obr. 3 - Schéma přípravy vzorků pro OxyBlot. Derivatizační reakce představuje vzorky, u kterých je měřena míra poškození proteinů oxidativním stresem. K 10 μ l vzorků v 6 % SDS je přidáváno 10 μ l roztoku 1 x DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazinu), který reaguje s karbonylovými skupinami proteinů poškozených oxidativním stresem za tvorby stabilního produktu DNP (2,4-dinitrophenylhydrazonu). Přidáním neutralizačního roztoku dojde k zastavení reakce. Následným provedením SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, elektropřenosem a imunodetekcí pomocí primární protilátky proti DNP a sekundární protilátky je možné pozorovat míru poškození proteinů oxidativním stresem. Pro ověření správnosti výsledku je využita negativní kontrola. Převzato a upraveno z [30].

Z takto připravených vzorků byla provedena SDS elektroforéza (každý vzorek obsahoval 10 µg proteinů), následovaná elektropřenosem a imunodetekcí stejným postupem jako v kapitole 3.6. a 3.7. Jako primární protilátka při imunodetekci byla použita králičí polyklonální protilátka proti DNP s ředěním 1:150. Sekundární (kozí) protilátka byla proti králičímu IgG s navázanou křenovou peroxidasou s ředěním 1:5000. Nitrocelulózová membrána byla vyvolána chemiluminiscenčně v přístroji Amersham Imager 600 (GE Healthcare, UK), pomocí komerčního peroxidasevého chemiluminiscenčního substrátu LuminataTM Crescendo Western HRP Substrate (Millipore, USA)

3.9. Hmotnostní spektrometrie

Proteomická analýza celých buněk *O. tauri* byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie v servisní proteomické laboratoři Biologické sekce PřF UK Mgr. Karlem Harantem dle zavedeného postupu [31].

Ve zkratce:

Pelety buněk z 50 ml buněčné kultury byly lyzovány zahřátím na 95°C po dobu 5 minut v přítomnosti 1 % SDS a štěpeny trypsinem. Peptidy byly po redukci a blokaci cysteinů a po odsolení separovány na nano-HPLC koloně EASY-Spray Pep Map C18 (50 cm x 75 cm, velikost částic 2 µm a pórů 100 Å, Dionex, Thermo Scientific, USA) a analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru Orbitrap FusionTM Q-OT-qIT (Thermo Scientific, USA). Data byla vyhodnocena programem Max Quant (verze 1.5.3.8) [32]. Kvantifikace byla provedena „label-free“ algoritmem. Hmotnostní spektra byla vyhodnocena proti databázi ORCAE [33] s přidánými běžnými kontaminantami a nastavením míry akceptovatelného falešně pozitivního výsledku (false discovery rate - FDR) na 1 % hranici.

3.10. Radioaktivní značení

Pelety buněk z 50 ml buněčné kultury byly resuspendovány v čistém médiu MFM. K takto připravené buněčné suspenzi byla přidána 1 μM koncentrace radioaktivního izotopu železa ^{55}Fe ve formě $^{55}\text{Fe(III)-EDTA}$. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubace bylo ke každému vzorku přidáno 250 μl STOP roztoku, který byl složený z 0,1 mM BPS (Sigma, USA) a 50 mM EDTA (Sigma, USA) [28]. Vzorky byly inkubovány po dobu 2 minut za laboratorní teploty. Po inkubaci následovala centrifugace při 13000 g při teplotě 4 °C po dobu 1 minuty. Následně byl odstraněn supernatant a pelet byl resuspendován v 900 μl WASH roztoku, který byl složený z 480 mM NaCl (Sigma, USA), 20 mM KCl (Sigma, USA), 0,1 mM MgCl_2 (Sigma, USA), 0,1 mM CaCl_2 (Sigma, USA), 1 mM BPS (Sigma, USA), 50 mM EDTA (Sigma, USA), 1 mM SHAM (Sigma, USA) a 10 mM HEPES (Sigma, USA) [28]. Znovu byly vzorky centrifugovány při 13000 g při teplotě 4°C po dobu 1 minuty. Po odstranění supernatantu byly vzorky resuspendovány v 100 μl roztoku chlornanu sodného (Savo) pro odstranění fotosyntetických pigmentů. Po sonikaci v sonikační lázni Elmasonic S (Elma Schmidbauer GmbH, Německo) při frekvenci 37 kHz, po dobu 5 minut, byly vzorky inkubovány přes noc na tmavém místě za laboratorní teploty. Druhý den bylo ke vzorkům přidáno 20 μl 3M HCl a vzorky byly opětovně sonikovány v sonikační lázni (za stejných podmínek). Následovala další inkubace přes noc na tmavém místě za laboratorní teploty. Po inkubaci bylo do každého vzorku přidáno 900 μl scintilačního roztoku Ultima Gold LLT (Perkin Elmer, USA), došlo k promíchání vzorků, následné sonikaci v lázni (za stejných podmínek) a opětovnému promíchání. Následovala další inkubace přes noc za laboratorní teploty. Nakonec byly vzorky změřeny na scintilačním detektoru Triathler Multilabel Tester (Hidex, Finsko) po dobu 30 sekund v režimu 3H.

3.11. Nativní elektroforéza

Pelety buněk z 50 ml buněčné kultury byly dezintegrovány sonikací v 300 µl lyzačního pufru složeného z 10 mM HEPES (Sigma, USA) o pH 7,5 s inhibitory proteas cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Německo) a 1 % digitoninu (Calbiochem, USA), který je před použitím promíchán a rozpuštěn varem po dobu 5 minut. Podmínky sonikace byly stejné jako v kapitole 3.3. Po sonikaci byly vzorky centrifugovány na 15 000 g po dobu 1 min při 4 °C pro odstranění nerozpuštěného materiálu. Pro přesné nanášení vzorků bylo změřeno množství proteinů v jednotlivých vzorcích (stejným postupem jako v kapitole 3.4.). K 16 µl vzorku byly přidány 4 µl vzorkového pufru Native PAGE™ Sample Buffer (4x) (Novex, Life Technologies, USA) a 0,8 µl Native PAGE™ 5 % G-250 Sample Additive (Novex, Life Technologies, USA). Takto připravené vzorky byly pipetovány do jednotlivých drah komerčně dostupného gradientového 4–16 % gelu Native PAGE™ Bis-Tris Gels (Novex, Life Technologies, USA). Pro elektroforézu byla použita sada dvou pufrů. Horní pufr byl namíchán ze 180 ml destilované vody, 10 ml modrého katodového pufru Native PAGE™ Cathode Buffer Additive (20x) (Novex, Life Technologies, USA) a 10 ml Native PAGE™ Running Buffer (20x) (Novex, Life Technologies, USA). Dolní pufr sestával z 25 ml pufru Native PAGE™ Running Buffer (20x) (Novex, Life Technologies, USA) a 475 ml destilované vody, podle návodu výrobce. Elektroforéza běžela za laboratorní teploty, při konstantním napětí 150 V, po dobu 90 minut. Po proběhnutí elektroforézy byly gely usušeny za sníženého tlaku po dobu 2 hodin a při teplotě 80 °C v sušičce Gel Dryer model 583 (Bio-Rad, USA). Usušené gely byly vyvolány pomocí speciální destičky pro detekci tritia BAS-IP TR 2025 E Tritium Screen (GE Healthcare, UK). Tato destička byla připravena pomocí předchozího vysvícení po dobu 10 minut na přístroji Image Eraser SF (Molecular Dynamics, USA). Gel byl na destičce exponován po dobu jednoho týdne. Destička byla následně skenována pomocí přístroje Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare, UK).

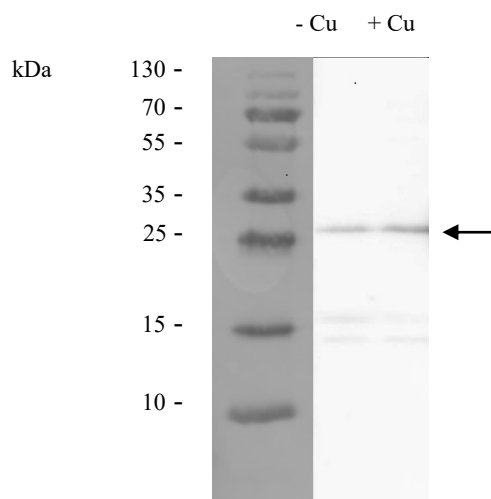
4 Výsledky

Experimenty byly zaměřeny zejména na dvě extrémní podmínky, vybočující z rovnováhy iontů mědi v buňce *O. tauri* a to sice nedostatek a nadbytek iontů mědi způsobující toxické účinky.

4.1. Nedostatek iontů mědi

4.1.1. Cytochrom *c* oxidasa a nedostatek iontů mědi

Pokusy se zaměřením na nedostatek iontů mědi vycházely především z předchozích dat získaných v naší laboratoři, zejména z proteomické analýzy. Z těchto dat byla u *O. tauri* zjištěna řada proteinů, které pro svou správnou funkci potřebují ionty mědi a byly jejich nedostatkem ovlivněny. Pro některé proteiny, které obsahují ionty mědi, však nebyly pomocí proteomické analýzy nalezeny relevantní výsledky. Jedním z takových proteinů je cytochrom *c* oxidasa, u které nebyla nalezena signifikantní data, a proto se tento protein stal tématem experimentu. Pro zabezpečení prostředí s nedostatkem iontů mědi v kultivačním médiu byl využit specifický chelátor iontů mědi BCS. Pro prostředí s ideálním množstvím iontů mědi se ke kultivačnímu médiu přidávalo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ do finální koncentrace 100 nM. Z takto připravených buněčných kultur byla provedena SDS elektroforéza, elektropřenos a imunodetekce. Využitím primární protilátky proti podjednotce 2 cytochrom *c* oxidasy (obsahující Cu_A centrum s ionty mědi) z *Arabidopsis thaliana* byl zjištěn vliv nedostatku iontů mědi na expresi cytochrom *c* oxidasy. Na obr. 4 je možné pozorovat dva nejsilnější proužky, které velikostně odpovídají podjednotce 2 cytochrom *c* oxidasy. Je patrné, že nedochází k žádné změně při nedostatku iontů mědi.



Obr. 4 - Reprezentativní nitrocelulózová membrána značená primární protilátkou proti podjednotce 2 cytochrom *c* oxidasy, vyvolaná pomocí sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidasou. Experimentální detaily viz kapitola 3.6. a 3.7. Membrána odráží míru exprese v buňkách kultivovaných za rozdílných podmínek. Nejvýraznější proužek v oblasti 25 kDa představuje cytochrom *c* oxidasu, podjednotku 2. Pokus byl proveden ve třech biologických replikátech s obdobným výsledkem.

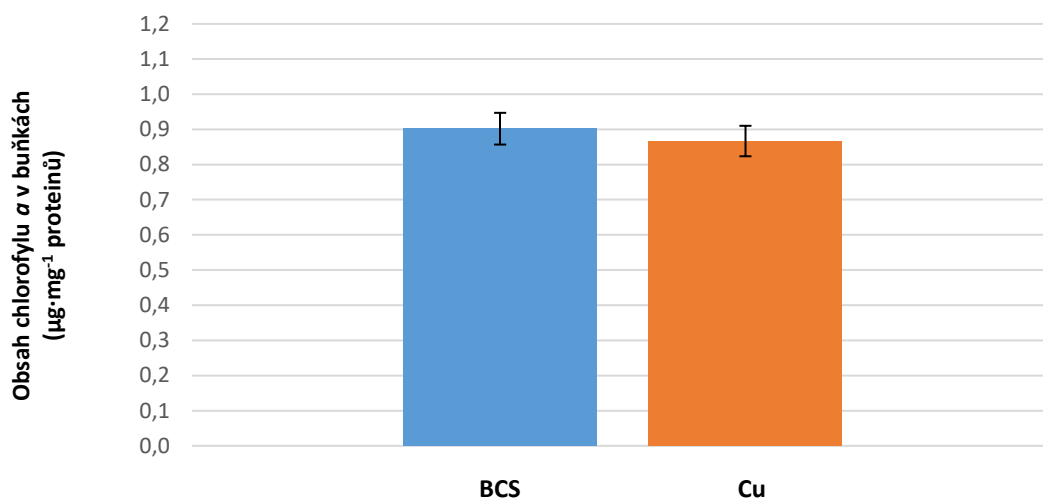
– Cu - buňky kultivované v přítomnosti 10 μ M BCS

+ Cu - buňky kultivované v přítomnosti 100 nM CuSO_4

4.1.2. Chlorofyl a nedostatek iontů mědi

Předchozí proteomické výsledky z naší laboratoře naznačily, že při nedostatku mědi dochází v buňkách *O. tauri* k zvýšené expresi genů zodpovědných za syntézu chlorofylu. Proto byl navržen experiment, při kterém byla pozorována změna množství chlorofylu *a* a *b*, za podmínek nedostatku iontů mědi. Postup kultivace buněčných kultur probíhal stejně jako v předchozím experimentu.

Pro normalizaci výsledků byla výsledná množství chlorofylu vztažena na příslušné množství proteinů. Výsledky pro jednotlivá měření jsou viditelné v grafu 2 a 3.

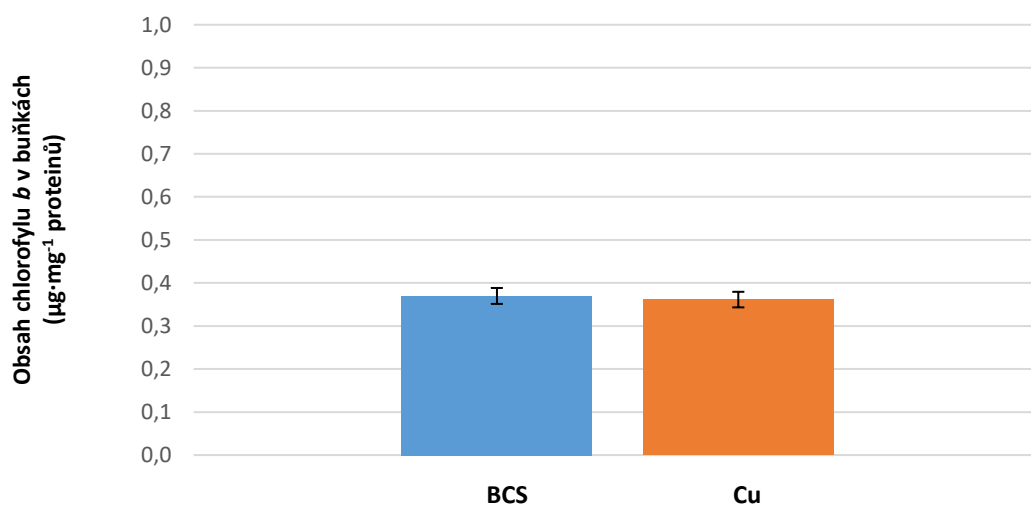


Graf 2 - Stanovení obsahu chlorofylu *a* v buňkách *O. tauri* využitím spektrofotometrie a určených molárních absorpčních koeficientů chlorofylu *a* a *b* extrahovaných v 80 % acetonu. Experimentální detaily viz kapitola 3.5. Graf zobrazuje obsah chlorofylu *a* v buňkách *O. tauri* kultivovaných v podmínkách:

BCS - buňky kultivované v přítomnosti 10 µM BCS

Cu - buňky kultivované v přítomnosti 100 nM CuSO₄

Množství chlorofylu je vztaženo na celkovou koncentraci proteinů. Pokus byl proveden v devíti biologických replikátech.



Graf 3 - Stanovení obsahu chlorofylu *b* v buňkách *O. tauri* využitím spektrofotometrie a určených molárních absorpčních koeficientů chlorofylu *a* a *b* extrahovaných v 80 % acetonu. Experimentální detaily viz kapitola 3.5. Graf zobrazuje obsah chlorofylu *b* v buňkách *O. tauri* kultivovaných v podmínkách:

BCS - buňky kultivované v přítomnosti 10 µM BCS

Cu - buňky kultivované v přítomnosti 100 nM CuSO₄

Množství chlorofylu je vztaženo na celkovou koncentraci proteinů. Pokus byl proveden v devíti biologických replikátech.

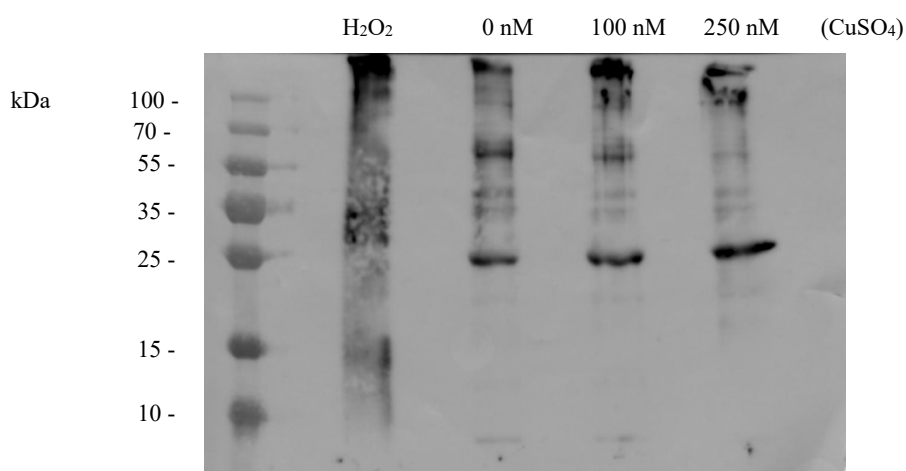
4.2. Nadbytek iontů mědi

4.2.1. Nadbytek iontů mědi a jejich toxicita

Protože zvýšená koncentrace iontů mědi má za následek poškození buněk, rozhodl jsem se vyzkoušet, jaké poškození způsobuje u buněk *O. tauri*. Jednou z prvních myšlenek bylo, že nejspíše dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (oxidativní stres). Pro měření oxidativního stresu byla využita metoda OxyBlot™ (Millipore, USA). Tato metoda umožňuje jednoduchou a citlivou imunodetekci karbonylových skupin, které jsou vnášeny do postranních řetězců proteinů vlivem oxidativního stresu. Pro detekci těchto skupin se využívá reakce 2,4-dinitrophenylhydrazinem s karbonylovými skupinami postranních řetězců proteinů za vzniku 2,4-dinitrophenylhydrazonu, který se pomocí SDS elektroforézy a následném elektropřenosu detekuje. Byly připraveny tři sady buněk kultivovaných v podmínkách: 1) bez přídavku CuSO₄, 2) v přítomnosti 100 nM CuSO₄ a 3) v přítomnosti 250 nM CuSO₄. Tyto kultivační podmínky byly určeny pomocí cytometrie (v předchozích experimentech v naší laboratoři) a ověřeny stanovením celkového množství proteinů v kultuře, které je možné vidět v tabulce 13. Hodnota 250 nM Cu byla určena jako koncentrace, při které už dochází k toxickému efektu iontů mědi (dochází již k zpomalení růstu) a buňky jsou ještě ve stavu vhodném pro experimenty (na rozdíl od koncentrace 500 nM Cu, kdy buňky umírají). Jako kontrola byla připravena kultura, ke které bylo přidáno den před pokusem 1 mM H₂O₂. Výsledky jsou pozorovatelné na obr. 5, kde nejvýraznější signál připadá na 1 mM H₂O₂ v první dráze. Z dalších tří drah vyplývá, že poškození proteinů oxidativním stresem dochází ve všech kultivačních podmínkách. Zdá se, že zvyšující se koncentrace iontů mědi nemá za následek vyšší poškození proteinů oxidativním stresem. Detekce proužků ve všech podmínkách může být zapříčiněna přípravou vzorků, které byly lyzovány sonikací.

Tabulka 13 - Stanovení množství proteinů v kultuře buněk *O. tauri* kultivovaných se zvyšující se koncentrací CuSO₄ využitím metody s bicinchoninovou kyselinou. Experimentální detaily viz kapitola 3.4. Pokus byl proveden ve čtyřech biologických replikátech.

Koncentrace CuSO ₄ (nM)	Celková koncentrace proteinů v kultuře (mg/ml)
0	3834 ± 246
100	3866 ± 234
250	2925 ± 254
500	1479 ± 304



Obr. 5 - Analýza oxidativního stresu imunochemickou detekcí nově vzniklých karbonylových sloučenin pomocí OxyBlot™ (Millipore, USA). Experimentální detaily viz kapitola 3.8. Nejvýraznější signál je u H₂O₂, které odpovídá buňkám poškozeným peroxidem vodíku. V případě 0 nM, 100 nM a 250 nM nejsou pozorovatelné výrazné změny v poškození proteinů mezi jednotlivými koncentracemi CuSO₄. Pokus byl proveden ve třech biologických replikátech s obdobným výsledkem.

H₂O₂ - buňky pěstované bez přídavku CuSO₄, ke kterým byl přidán 1 mM H₂O₂

0 nM - buňky pěstované bez přídavku CuSO₄

100 nM - buňky pěstované v přítomnosti 100 nM CuSO₄

250 nM - buňky pěstované v přítomnosti 250 nM CuSO₄

4.2.2. Proteomická analýza

Pro pozorování komplexního toxického efektu iontů mědi, byla provedena proteomická analýza buněk *O. tauri* kultivovaných v podmínkách 100 nM a 250 nM CuSO₄. Bylo nalezeno 224 proteinů, které měly zvýšenou expresi u buněk pěstovaných za toxické koncentrace iontů mědi a 129 proteinů se sníženou expresí u buněk pěstovaných za toxické koncentrace iontů mědi. Všechny ovlivněné proteiny byly zařazeny do funkčních kategorií (viz Příloha) na základě anotace v databázi ORCAE [33] a podle předešlé transkriptomické studie [34]. Při nejasnostech byla provedena manuální analýza pomocí predikčního programu HHpred [35], s využitím databáze multisekvenčních alignmentů PfamA [36] a databáze konzervovaných domén NCBI [37]. Seznam všech ovlivněných proteinů s příslušnými daty je součástí přílohy. Proteiny významně měnící hladiny byly vybrány na základě rozdílu jejich množství mezi vzorky. Uvedeny jsou proteiny měnící svoji hladinu více než dvakrát. Potvrzení statistické signifikance probíhalo v programu Perseus 1.5.2.4 pomocí Studentova t-testu.

Dále byla sestavena tabulka (viz tabulka 14) z proteinů, které by se mohli podílet na obraně proti iontům mědi nebo souvisí s toxicitou iontů mědi. Jedním z nejvíce ovlivněných proteinů jsou protein podobný proteinu HSP20 a ribonukleotid reduktasa.

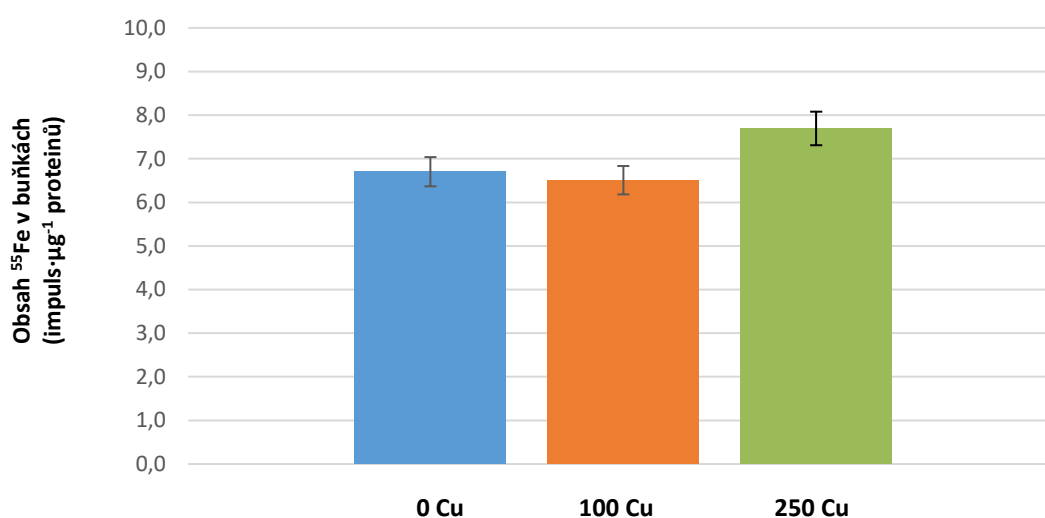
Zajímavostí byla také snížená exprese proteinu FEA1, který má velký podíl na příjmu a utilizaci iontů železa v buňkách [34]. Další experimenty vycházejí z tohoto poznatku.

Tabulka 14 - Shrnutí výsledků proteomické analýzy *O. tauri* v přítomnosti rozdílných koncentrací Cu^{2+} . Tabulka zobrazuje proteiny, které mohou úzce souviset s toxicitou iontů mědi. Ukazuje rozdíly v množství proteinů mezi buňkami pěstovanými za toxické a normální koncentrace iontů mědi na základě proteomické analýzy (viz Příloha). Nejvíce ovlivněnými proteiny jsou HSP20 a ribonukleotid reduktasa. Dalším zajímavým objevem proteinů se zvýšenou expresí v buňkách pěstovaných v toxických podmínkách, jsou proteiny související s metabolismem folátů: 5-methyltetrahydrofolát/homocystein methyltransferasa a bifunkční dihydrofolát reduktasa/thymidilát synthasa. Posledním ze zajímavých proteinů se zvýšenou expresí byla alternativní oxidasa. Mezi proteiny se sníženou expresí patří FEA1 a IscU. Oba tyto proteiny souvisí s příjmem a utilizací iontů železa.

Název proteinu	Násobek změny množství proteinu mezi vzorky buněk kultivovaných v podmínkách s 250 nM CuSO_4 a 100 nM CuSO_4
Protein podobný HSP20	43,601
Ribonukleotid reduktasa	21,272
5-methyltetrahydrofolát/homocystein methyltransferasa	3,246
Bifunkční dihydrofolát reduktasa/thymidilát synthasa	3,073
Alternativní oxidasa	2,968
FEA1	-2,254
IscU	-3,158

4.2.3. Radioaktivní značení pomocí ^{55}Fe

Příjem iontů železa a mědi je v buňkách často propojen [38]. Protože v proteomických datech se objevila snížená exprese proteinu FEA1, který má velký podíl na příjmu a utilizaci iontů železa v buňkách [34], byly provedeny následující dva experimenty. Pro zjištění, jak ovlivňuje zvýšená koncentrace iontů mědi příjem iontů železa, bylo využito značení pomocí radioaktivního izotopu železa ^{55}Fe . První experiment spočíval v měření celkové koncentrace přijatých iontů železa buňkou. Ke kulturám buněk pěstovaným při rozdílných koncentracích CuSO_4 , jako zdroje iontů mědi, byl přidán radioaktivní izotop železa ^{55}Fe jako $^{55}\text{Fe(III)-EDTA}$ do finální koncentrace $1\ \mu\text{M}$. Inkubace byla zastavena přidavkem směsi chelatačních činidel [28]. Po odstranění přebytečných iontů železa pomocí chelátorů byl ke vzorkům přidán scintilační roztok a provedeno měření [28], [39], [40]. V grafu 4 je možno pozorovat změny v množství přijatého ^{55}Fe buňkami *O. tauri*. Zdá se, že zvyšující se koncentrace iontů mědi nemá vliv na příjem iontů železa.



Graf 4 - Stanovení obsahu přijatých iontů železa v buňkách *O. tauri* pomocí radioaktivního značení izotopem železa ^{55}Fe . Experimentální detaily viz kapitola 3.10. Graf zobrazuje množství přijatého ^{55}Fe buňkami *O. tauri* kultivovanými v podmínkách:

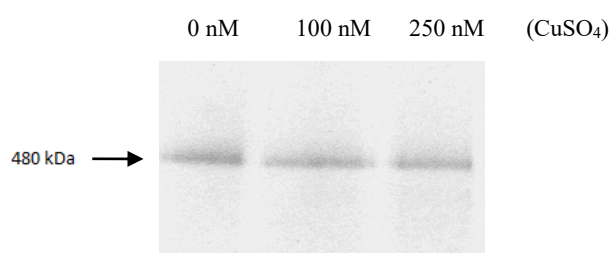
0 Cu - buňky kultivované bez přidavku CuSO_4

100 Cu - buňky kultivované v přítomnosti $100\ \text{nM}\ \text{CuSO}_4$

250 Cu - buňky kultivované v přítomnosti $250\ \text{nM}\ \text{CuSO}_4$

Množství přijatého ^{55}Fe je vztaženo na celkovou koncentraci proteinů. Pokus byl proveden ve čtyřech biologických replikátech.

Jako doplňující experiment pro porovnání utilizace iontů železa při zvýšené koncentraci iontů mědi byla provedena nativní separace proteinů a autoradiografie. K novým buněčným kulturám byl přidán $^{55}\text{Fe(III)}$ -citrát do finální koncentrace 1 μM . Citrát je vhodnější zdroj iontů železa pro tyto experimenty než $^{55}\text{Fe(III)}$ -EDTA [28]. Buňky byly zlyzovány a proteiny byly rozděleny pomocí nativní elektroforézy. Na výsledcích z autoradiografie je pozorovatelný pouze jeden výrazný proužek (viz obr. 6). Tento proužek byl v předešlých experimentech v naší laboratoři identifikován jako ferritin [40]. Na obrázku je možno pozorovat, že se zvyšující se koncentrací iontů mědi nedochází k žádné změně v obsahu iontů železa ve ferritinu.



Obr. 6 - Reprezentativní autoradiografie $^{55}\text{Fe(III)}$ -citrát značených buněk. Experimentální detaily viz kapitola 3.11. Nejvýraznější proužek odpovídá proteinu ferritin. Pokus byl proveden ve třech biologických replikátech s obdobným výsledkem.

0 nM - buňky pěstované bez přídavku CuSO_4

100 nM - buňky pěstované v přítomnosti 100 nM CuSO_4

250 nM - buňky pěstované v přítomnosti 250 nM CuSO_4

5 Diskuze

Z předchozí práce v naší laboratoři bylo zjištěno několik poznatků o vlivu nedostatku iontů mědi na *O. tauri*. Proteomickou analýzou bylo zjištěno, že při kultivaci těchto buněk v prostředí s nedostatkem iontů mědi docházelo ke snížení exprese plastocyaninu. Plastocyanin je protein obsahující ionty mědi a jako součást fotosyntetického aparátu má roli přenašeče elektronů. Na základě těchto dat jsme však nebyli schopni zjistit, zda dochází ke změně exprese u proteinu cytochrom *c* oxidasy, který rovněž obsahuje ionty mědi a je součástí dýchacího řetězce. Provedením experimentu s pomocí protilátky proti podjednotce 2 cytochrom *c* oxidasy, která obsahuje Cu_A centrum, z *Arabidopsis thaliana* jsem zjistil, že nedochází k prokazatelné změně v expresi enzymu cytochrom *c* oxidasy. Tento výsledek odpovídá provedeným experimentům na řase *Chlamydomonas reinhardtii*, kde bylo naměřeno výrazné snížení exprese proteinu plastocyaninu a žádná změna u cytochrom *c* oxidasy [17]. Rozdílem mezi řasami *O. tauri* a *C. reinhardtii* je, že *C. reinhardtii* dokáže nahradit chybějící plastocyanin záložním systémem pro přenos elektronů v rámci fotosyntézy. Tím pádem může kompenzovat nedostatek iontů mědi přesunem z plastocyaninu na cytochrom *c* oxidasu. U *O. tauri* se ale takovýto systém nenachází [27], přesto exprese cytochrom *c* oxidasy je přednější před plastocyaninem.

Tak jako v předchozím případě jsem i v dalším experimentu vycházel z proteomických dat z naší laboratoře, které ukazovaly zvýšenou expresi proteinů podílejících se na tvorbě chlorofylu v buňkách kultivovaných za nedostatku iontů mědi. Proto jsem se rozhodl vyzkoušet, zdali nedostatek iontů mědi působí na koncentraci chlorofylu *a* a *b* v buňce. Ukázalo se, že k žádné změně v koncentraci chlorofylů nedochází. Nicméně to nevylučuje možnost, že při nedostatku iontů mědi dochází v buňkách *O. tauri* k zvýšené degradaci a tvorbě chlorofylů, při zachování stejného celkového množství.

Po ověření, jaký vliv má nedostatek iontů mědi na *O. tauri* jsem se rozhodl vyzkoušet vliv nadbytku iontů mědi a jejich toxicitu. Z předchozích experimentů v naší laboratoři a provedením sady měření celkové koncentrace proteinů při postupně zvyšující se koncentraci iontů mědi jsem stanovil hraniční koncentraci. Prvním experimentem bylo ověřit, zdali vlivem iontů mědi dochází k oxidativnímu stresu, konkrétně k oxidativnímu poškození proteinů. Provedením metody OxyBlot jsem dospěl k závěru, že zvyšující se koncentrace iontů mědi neovlivní míru poškození proteinů oxidativním stresem.

Další experiment byl proto zvolen tak, aby byl vidět celkový profil proteinů ovlivněných ionty mědi. Proteomickou analýzou bylo objeveno několik zajímavých proteinů, které měli signifikantně ovlivněnou expresi. Jedním z takových jsou proteiny účastníci se metabolismu folátů. Prvním z nich je bifunkční enzym dihydrofolát reduktasa/thymidilát synthasa, který redukuje dihydrofolát na tetrahydrofolát a u rostlin je spojen s thymidilát syntesou [41]. Druhým proteinem je enzym 5-methyltetrahydrofolát/homocystein methyltransferasa, který je součástí biosyntézy methioninu *de novo* [42]. Foláty pomáhají chránit buňku před biotickým i abiotickým stresem [41]. Například u *Arabidopsis thaliana* byla ukázána zvýšená exprese genů podílejících se na metabolismu folátů za podmínek oxidativního stresu [43]. Jedná se tedy o jednu z možností, jak by se mohli buňky *O. tauri* bránit toxickým koncentracím iontů mědi. Další protein, jehož exprese je signifikantně zvýšená při nadbytku mědi, je alternativní oxidasa. Tato terminální oxidasa je důležitou mitochondriální složkou mechanismu ochrany rostlin před oxidativním stresem [44] a její indukce byla popsána i v podmínkách nadbytku iontů mědi [45]. Proteinem s nejvíce zvýšenou expresí je ribonukleotid reduktasa. Jedná se o enzym, který katalyzuje redukci ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy a je tedy důležitou součástí syntézy nukleotidů. Jak ukázaly experimenty na bakteriích, toxicita iontů mědi inhibuje tvorbu deoxyribonukleotidů [46]. Jedná se tedy o další způsob, jak by mohl být nadbytek iontů mědi pro *O. tauri* toxický. Proteinem s nejvíce zvýšenou expresí je protein HSP20. Tyto malé proteiny hrají důležitou roli při buněčném stresu, kde pomáhají při opravě poškozených nebo špatně složených proteinů [47]. Zároveň mají ochrannou funkci před oxidativním stresem způsobeným toxicitou iontů mědi (funguje jako odpověď na poškození proteinů ionty mědi v cytoplazmě) [48].

Mezi proteiny, u kterých byla exprese výrazně snížena při vysoké koncentraci mědi, patří protein IscU podílející se na tvorbě železo-sírných center. Tyto kofaktory jsou vysoce citlivé na oxidativní stres a předpokládá se, že k jejich poškození dochází právě na proteinu IscU [49].

Zvláštností byl objev proteinu FEA1 mezi proteiny se sníženou expresí. Protože se jedná o důležitý protein v příjmu a utilizaci iontů železa, rozhodl jsem se prozkoumat, jaký vliv by mohl mít nadbytek iontů mědi na příjem iontů železa. Z provedených experimentů bylo zjištěno, že nedochází k žádné změně v příjmu a utilizaci iontů železa. Vysvětlením by mohla být celková vysoká míra exprese FEA1 (FEA1 je jedním z nejvíce exprimovaných proteinů u *O. tauri* [34]). Částečné snížení exprese FEA1 se tak neprojevuje v příjmu iontů železa. Je však možné, že FEA1 hraje roli i v příjmu iontů mědi, a to s menší afinitou, následkem čeho i malé snížení exprese způsobuje pokles jejich příjmu.

6 Závěr

Pomocí protilátky proti podjednotce 2 cytochrom *c* oxidasy, která obsahuje Cu_A centrum, bylo zjištěno, že za podmínek s nedostatečným množstvím iontů mědi nedochází k prokazatelné změně v expresi tohoto proteinu u buněk *O. tauri*. Zdá, že exprese cytochrom *c* oxidasy dostává přednost před plastocyaninem, který taktéž obsahuje ionty mědi a slouží jako přenašeč elektronů v rámci fotosyntézy, za podmínek s limitujícím množstvím iontů mědi.

Provedením experimentu, který zkoumal, zdali nedostatek iontů mědi působí na koncentraci chlorofylu *a* a *b* u *O. tauri* bylo zjištěno, že k žádné změně v koncentraci chlorofylů nedochází. Nicméně není vyloučeno, že dochází v buňkách *O. tauri* ke zvýšené degradaci a tvorbě chlorofylů, při zachování stejného celkového množství.

Ověřením vlivu nadbytku iontů mědi na *O. tauri* přineslo několik zajímavých výsledků. Použitím metody OxyBlot, díky které lze pozorovat oxidativní poškození proteinů v buňce, bylo zjištěno, že zvyšující se koncentrace iontů mědi nemá vliv na míru poškození proteinů oxidativním stresem. Provedením proteomické analýzy byla objevena řada proteinů se signifikantně ovlivněnou expresí u buněk *O. tauri* pěstovaných za toxické koncentrace iontů mědi. Mezi proteiny se signifikantně zvýšenou expresí patřily proteiny účastníci se metabolismu folátů: bifunkční enzym dihydrofolát reduktasa/thymidilát synthasa a enzym 5-methyltetrahydrofolát/homocystein methyltransferasa. Dalším proteinem se zvýšenou expresí byla alternativní oxidasa, která je u rostlin součástí mechanismu ochrany před oxidativním stresem [44]. Proteinem s nejvíce zvýšenou expresí byla ribonukleotid reduktasa, enzym účastnící se syntézy nukleotidů a protein HSP20, který chrání buňku při toxické koncentraci iontů mědi [48]. Mezi proteiny, u kterých byla exprese signifikantně snížena, byl protein IscU, který se podílí na tvorbě železo-sírných center [49]. Všechny tyto proteiny by se v budoucnu mohly stát předmětem zkoumání jako možná cesta k odhalení vlivu nadbytku iontů mědi na buňky *O. tauri*.

Zvláštním objevem mezi proteiny se signifikantně sníženou expresí, byl protein FEA1. Jedná se o důležitý protein v příjmu a utilizaci iontů železa [34], který mohl přinést odpověď na to, jaký vliv by mohl mít nadbytek iontů mědi na příjem iontů železa. Z experimentů ale nebyl prokázán vliv nadbytku iontů mědi na příjem iontů železa.

7 Literatura

- [1] I. Bertini, H. B. Gray, E. I. Stiefel a J. S. Valentine. (2006) Biological inorganic chemistry: structure and reactivity. *University Science Books, Sausalito, California*
- [2] K. Balamurugan a W. Schaffner. (2006) Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763(7):737–746
- [3] M. M. Pena, J. Lee a D. J. Thiele. (1999) A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129(7):1251–1260
- [4] K. A. Koch, M. M. Pena a D. J. Thiele. (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem. Biol.* 4:549–560
- [5] S. Puig a D. J. Thiele. (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(2):171–180
- [6] J. T. Rubino a K. J. Franz. (2012) Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.* 107(1):129–143
- [7] T. Nevitt, H. Ohrvik a D. J. Thiele. (2012) Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823(9):1580–1593
- [8] D. J. Eide. (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.* 18:441–69
- [9] E. D. Harris. (2000) Cellular copper transport and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20:291–310
- [10] T. V. O'Halloran a V. C. Culotta. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275(33):25057–25060
- [11] T. D. Rae. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284(5415):805–808

- [12] S. J. Lin a V. C. Culotta. (1995) The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(4):3784–3788
- [13] C. Askwith, D. Eide, A. van Ho, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe a J. Kaplan. (1994) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76:403–410
- [14] A. C. Rosenzweig a T. V. O’Halloran. (2000) Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4(2):140–147
- [15] P. Dziegiel, B. Pula, C. Kobierzycki, M. Stasiolek a M. Podhorska-Okolow. (2016) Metallothioneins in normal and cancer cells. 218:3–20
- [16] C. E. Blaby-Haas a S. S. Merchant. (2012) The ins and outs of algal metal transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823(9):1531–1552
- [17] J. Kropat, S. D. Gallaher, E. I. Urzica, S. S. Nakamoto, D. Strenkert, S. Tottey, A. Z. Mason a S. S. Merchant. (2015) Copper economy in *Chlamydomonas*: prioritized allocation and reallocation of copper to respiration vs. photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(9):2644–51
- [18] A. Hong-Hermesdorf, M. Miethke, S. D. Gallaher, J. Kropat, S. C. Dodani, J. Chan, D. Barupala, D. W. Domaille, D. I. Shirasaki, J. A. Loo, P. K. Weber, J. Pett-Ridge, T. L. Stemmler, C. J. Chang a S. S. Merchant. (2014) Subcellular metal imaging identifies dynamic sites of Cu accumulation in *Chlamydomonas*. *Nat. Chem. Biol.* 10(12):1034–42
- [19] J. M. Vraspir a A. Butler. (2009) Chemistry of marine ligands and siderophores. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 1:43–63
- [20] L. M. Laglera a C. M. G. van den Berg. (2003) Copper complexation by thiol compounds in estuarine waters. *Mar. Chem.* 82(1–2):71–89
- [21] J. W. Moffett, L. E. Brand, P. L. Croot a K. A. Barbeau. (1997) Cu speciation and cyanobacterial distribution in harbors subject to anthropogenic Cu inputs. *Limnol. Oceanogr.* 42(5):789–799

- [22] M. I. Heller a P. L. Croot. (2014) Copper speciation and distribution in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Mar. Chem.* 173(2):253–268
- [23] A. Butler. (1998) Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. *Science* 281(5374):207–210
- [24] C. Courties, A. Vaquer, M. Troussellier, J. Lautier, M. J. Chretiennot-Dinet, J. Neveux, C. Machado a H. Claustre. (1994) Smallest eukaryotic organism. *Nature* 370(6487):255
- [25] M. J. Chretiennot-Dinet, C. Courties, A. Vaquer, J. Neveux, H. Claustre, J. Lautier a M. C. Machado. (1995) A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia* 34(4):285–292
- [26] C. Courties, R. Perasso, M. J. Chretiennot-Dinet, M. Gouy, L. Guillou a M. Troussellier. (1998) Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus Tauri*. *J. Phycol.* 849:844–849
- [27] B. Palenik, J. Grimwood, A. Aerts, P. Rouze, A. Salamov, N. Putnam, C. Dupont, R. Jorgensen, E. Derelle, S. Rombauts, K. Zhou, R. Otiilar, S. S. Merchant, S. Podell, T. Gaasterland, C. Napoli, K. Gendler, A. Manuell a V. Tai. (2007) The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(18):7705–10
- [28] H. Botebol, R. Sutak, I. F. Scheiber, P. L. Blaiseau, F. Y. Bouget, J. M. Camadro a E. Lesuisse. (2014) Different iron sources to study the physiology and biochemistry of iron metabolism in marine micro-algae. *BioMetals* 27(1):75–88
- [29] R. J. Porra, W. A. Thompson a P. E. Kriedemann. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous - equations for assaying chlorophyll *a* and chlorophyll *b* extracted with 4 different solvents - verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975(3):384–394

- [30] J. N. Stankowski, S. G. Codreanu, D. C. Liebler a B. McLaughlin. (2010) Analysis of protein targets by oxidative stress using the OxyBlot and Biotin-Avidin-capture methodology. *Neuromethods* 56:365-381
- [31] A. S. Hebert, A. L. Richards, D. J. Bailey, A. Ulbrich, E. E. Coughlin, M. S. Westphall a J. J. Coon. (2014) The one hour yeast proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 13(1):339–347
- [32] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Lubner a I. Paron. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell.* 13(9):2513–2526
- [33] L. Sterck, K. Billiau, T. Abeel, P. Rouze a Y. van de Peer. (2012) ORCAE: online resource for community annotation of eukaryotes. *Nat. Methods* 9(11):1041
- [34] G. Lelandais, I. Scheiber, J. Paz-Yepes, J. C. Lozano, H. Botebol, J. Pilatova, V. Zarsky, T. Leger, P. L. Blaiseau, C. Bowler, F. Y. Bouget, J. M. Camadro, R. Sutak, E. Lesuisse, A. Allen, J. Laroche, U. Maheswari, M. Lommer a N. Schauer. (2016) *Ostreococcus tauri* is a new model green alga for studying iron metabolism in eukaryotic phytoplankton. *BMC Genomics* 17(1):319
- [35] J. Soding. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21(7):951–960
- [36] M. Punta, P. Coggill, R. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Boursnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. Sonnhammer, S. Eddy, A. Bateman a R. Finn. (2012) The Pfam protein families databases. *Nucleic Acids Res.* 30(1):1–12
- [37] A. Marchler-Bauer, A. R. Panchenko, B. A. Shoemaker, P. A. Thiessen, L. Y. Geer a S. H. Bryant. (2002) CDD: A database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 30(1):281–283

- [38] R. Sutak, E. Lesuisse, J. Tachezy a D. R. Richardson. (2008) Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol.* 16(6):261–268
- [39] R. Sutak, H. Botebol, P. L. Blaiseau, T. Leger, F. Y. Bouget, J. M. Camadro a E. Lesuisse. (2012) A comparative study of iron uptake mechanisms in marine microalgae: iron binding at the cell surface is a critical step. *Plant Physiol.* 160(4):2271–2284
- [40] H. Botebol, E. Lesuisse, R. Sutak, C. Six, J. C. Lozano, P. Schatt, V. Verge, A. Kirilovsky, J. Morrissey, T. Leger, J. M. Camadro, A. Gueneugues, C. Bowler, S. Blain a F. Y. Bouget. (2015) Central role for ferritin in the day/night regulation of iron homeostasis in marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(47):1–6
- [41] V. Gorelova, L. Ambach, F. Rebeille, C. Stove a D. van der Straeten. (2017) Folates in plants: research advances and progress in crop biofortification. *Front. Chem.* 5(3):1–20
- [42] C. Eckermann, J. Eichel a J. Schroder. (2000) Plant methionine synthase: new insights into properties and expression. *Biol. Chem.* 381(8):695–703
- [43] C. J. Baxter, H. Redestig, N. Schauer, D. Reipsilber, K. R. Patil, J. Nielsen, J. Selbig, J. Liu, A. R. Fernie a L. J. Sweetlove. (2007) The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Society* 143(1):312–325
- [44] G. C. Vanlerberghe. (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14(4):6805–6847
- [45] M. Padua, S. Aubert, A. Casimiro, R. Bligny, A. H. Millar a D. A. Day. (1999) Induction of alternative oxidase by excess copper in sycamore cell suspensions. *Plant Physiol. Biochem.* 37(2):131–137
- [46] M. D. L. Johnson, T. E. Kehl-Fie a J. W. Rosch. (2015) Copper intoxication inhibits aerobic nucleotide synthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics* 7:786–794

- [47] A. Mainz, B. Bardiaux, F. Kuppler, G. Multhaup, I. C. Felli a R. Pierattelli. (2012) Structural and mechanistic implications of metal binding in the small heat-shock protein α B-crystallin. *J. Biol. Chem.* 287(2):1128–1138
- [48] E. Matuszewska, J. Kwiatkowska a D. Kuczyn. (2017) *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiol.* (5):1739–1747
- [49] S. Jang a J. A. Imlay. (2010) Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system and OxyR induces the Suf system to compensate. *Mol. Microbiol.* 78(6):1448–1467

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka